

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

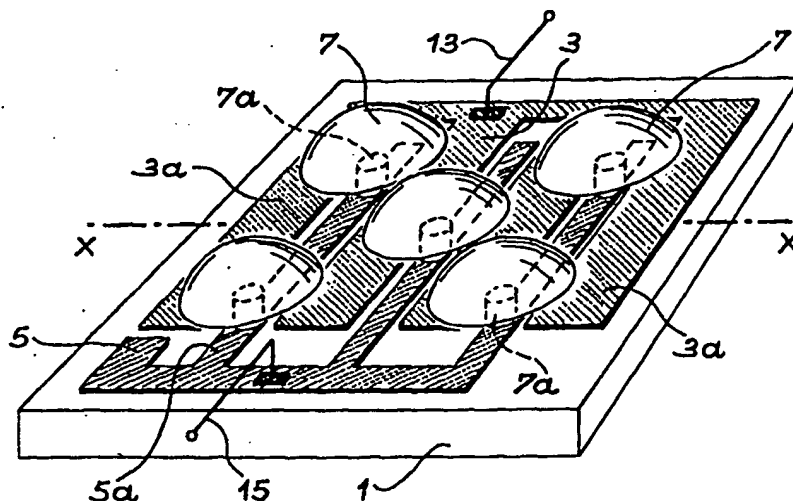
<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 27/327, 33/543</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/29740 (43) Date de publication internationale: 9 juillet 1998 (09.07.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/02440 (22) Date de dépôt international: 29 décembre 1997 (29.12.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/16201 30 décembre 1996 (30.12.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CLERC, Jean-Frédéric [FR/FR]; 8, rue Mont Perthuis, F-38120 Le Fontanil (FR). MASSIT, Claude [FR/FR]; 248, chemin des Petites Roches, F-38330 Saint-Ismier (FR). (74) Mandataire: BREVATOME; 25, rue de Ponthieu, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>	

(54) Title: MICRO SYSTEM FOR BIOLOGICAL ANALYSES AND METHOD FOR MAKING SAME

(54) Titre: MICROSYSTEME POUR ANALYSES BIOLOGIQUES ET SON PROCEDE DE FABRICATION

(57) Abstract

The invention concerns a micro system for biological analysis for detecting analytes, for example antigens, in a sample. The micro system comprises: an isolating substrate (1) coated with a first conductor (3) forming a first electrode, and a second conductor (7) bearing a plurality of conductive elements (7a) extending above the first conductor so as to form a second coplanar electrode arranged at a distance d from the first conductor; and means (13, 15) for polarising the first and second conductors. The electrode(s) are covered with a specific ligand. After a sample has been introduced on the substrate, the presence of analyte in the sample can be detected by measuring the impedance between electrodes 3 and 7, which will indicate the formation or not of an analyte-ligand layer on the electrode(s).



OFFICIAL COPY

(57) Abrégé

L'invention concerne un microsystème pour analyse biologique, destiné à la détection d'analytes, par exemple d'antigènes, dans un échantillon. Le microsystème comprend: un support isolant (1) revêtu d'un premier conducteur (3) formant une première électrode, et d'un second conducteur (5) supportant une pluralité d'éléments conducteurs (7) s'étendant au-dessus du premier conducteur de façon à former une seconde électrode coplanaire disposée à une distance d du premier conducteur; et des moyens de polarisation (13, 15) du premier et du second conducteur. La ou les électrode(s) sont recouvertes d'un ligand spécifique. Après introduction d'un échantillon sur le support, on peut détecter la présence d'analyte dans l'échantillon par mesure de l'impédance entre les électrodes (3 et 7), qui traduira la formation ou non d'une couche analyte-ligand sur la (les) électrode(s).

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LR	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark		Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

MICROSYSTEME POUR ANALYSES BIOLOGIQUES ET SON PROCEDE DE FABRICATION

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention a pour objet un microsysteme pour analyses biologiques, utilisable
10 notamment dans le secteur de la santé, de l'industrie agro-alimentaire et de l'environnement.

Elle s'applique plus particulièrement à la réalisation de microsystemes d'analyses biologiques destinés au diagnostic in vitro, notamment en analyse
15 des maladies infectieuses (détection du HIV, des mycobactéries etc.).

Dans ces domaines où il s'agit de faire des économies de santé, on recherche actuellement des microsystemes d'analyse à usage unique, qui soient
20 simples d'emploi, utilisent de très faibles volumes d'échantillon et reposent sur le principe d'une détection directe ne nécessitant ni réactif de détection (marqueur ou autre), ni amplification du signal de détection.

25

Etat de la technique antérieure.

Depuis environ quatre ans, de nouveaux formats de tests (multiaffinité, intégration de fonctions
30 telles que l'amplification génique, séparation par électrophorèse) ont fait leur apparition et leurs applications industrielles semblent importantes, bien

qu'aujourd'hui elles soient principalement localisées dans le séquençage du génome humain.

Ces nouveaux tests doivent surtout leur succès à l'introduction des microtechnologies dans le domaine
5 biologique, permettant ainsi, par l'intégration et la parallélisation, d'atteindre des performances, des vitesses et des sensibilités élevées. Par ailleurs, les microtechnologies conduisent à des solutions nouvelles tant techniques (miniaturisation, intégration)
10 qu'économiques (production en masse), de nature à relancer le développement des biocapteurs.

Ainsi, on a réalisé récemment des support de tests pour la détection immunochimique directe, constitués de couches minces de semiconducteur et de
15 silice avec des anticorps liés de façon covalente à ces couches, qui permettent de détecter la présence d'un antigène capable de réagir avec ces anticorps par mesure de la capacité de l'ensemble (voir référence 1 : Battaillard et al, dans Analytical Chemistry, 60,
20 1988, pages 2374-2379). Un autre microsystème du même type a été décrit par Schyberg et al, dans la référence 2 : Sensors and Actuators, B26-27, 1995, pages 457-460.

Les documents référencés 3 : FR-A-2 598 227 et
4 : EP-A-244 326 décrivent aussi un procédé de
25 détection et/ou d'identification d'une substance biologique dans un échantillon liquide à l'aide de mesures électriques. Selon ce procédé, on met en contact l'échantillon avec une plaque porte-réactif comportant un ligand spécifique de la substance
30 biologique à détecter, cette plaque pouvant être réalisée en un matériau semi-conducteur tel que le silicium, et étant revêtue d'une couche isolante de silice, puis on mesure les composantes C et/ou R de

l'impédance électrique du système pour détecter la présence de la substance biologique dans l'échantillon.

Tous ces systèmes font appel à la réaction de reconnaissance entre la substance biologique à détecter et un ligand spécifique de cette substance pour réaliser une détection directe de cette dernière sans avoir à utiliser d'autres réactifs ou moyens de détection (marqueurs, réactions d'amplification du signal etc). En effet, cette réaction de reconnaissance se traduit par la formation d'une couche active de très faible épaisseur, par exemple de 100 Å à 1 000 Å, qui présente des caractéristiques électriques, par exemple une capacité et une impédance, différentes de celles du système en l'absence de ladite couche.

Cependant, avec les systèmes connus actuellement la distance entre les électrodes de mesure disposées de part et d'autre de la couche active reste importante par rapport à l'épaisseur de cette couche active ; et ceci nuit à la sensibilité de détection.

La présente invention a précisément pour objet un microsystème d'analyse biologique, basé sur le même principe, c'est-à-dire sur la réaction de reconnaissance de la substance biologique ou analyte à détecter avec un ligand spécifique, qui permet, d'effectuer la mesure avec une distance entre les électrodes de mesure beaucoup plus faible et d'améliorer de ce fait la sensibilité du dispositif.

Exposé de l'invention

30

Selon l'invention, le dispositif de détection d'un analyte comprend :

- un support isolant revêtu d'un premier conducteur formant une première électrode, et d'un second conducteur supportant une pluralité d'éléments conducteurs s'étendant au-dessus du premier conducteur
- 5 de façon à former une seconde électrode coplanaire disposée à une distance d du premier conducteur, et
- des moyens de polarisation du premier et du second conducteurs.

Selon l'invention l'une au moins des
10 électrodes, de préférence les deux, sont recouvertes d'un ligand spécifique L de l'analyte à détecter.

De la sorte, lorsqu'on dépose sur le support isolant muni des électrodes un échantillon à analyser au contact des deux électrodes, l'analyte A
15 éventuellement présent dans cet échantillon va réagir avec le ligand L pour former un complexe LA, soit une couche active sur les électrodes. La formation de cette couche pourra être détectée en mesurant l'impédance entre les électrodes.

20 Avec le dispositif de l'invention, la structure coplanaire particulière des électrodes permet de disposer les deux électrodes à une distance d très faible, par exemple de 20 à 500 nm, qui est de l'ordre de 2 à 5 fois l'épaisseur de la couche active formée
25 par réaction de l'analyte avec le ligand spécifique se trouvant sur les électrodes. Ainsi, la mesure d'impédance portera sur la couche elle-même et non sur une couche d'air ou de fluide non représentative du phénomène de reconnaissance entre l'analyte et le
30 ligand spécifique.

Cette disposition particulière des électrodes sur le même support permet d'obtenir une multiplicité de zones de recouvrement entre les premières et

deuxièmes électrodes entraînant une grande surface totale de recouvrement répartie. La répartition de la surface de recouvrement et l'absence de second support permet à l'analyte un accès rapide aux électrodes par rapport à un dispositif où les électrodes sont chacune sur un support distinct et où le fluide doit pénétrer dans un espace situé entre deux structures épaisses. Plus cet espace est faible, plus le fluide est gêné d'où des problèmes de temps d'accès et d'homogénéité.

Par ailleurs, cette disposition permet d'augmenter la surface développée des électrodes et d'obtenir ainsi, lors de la mesure d'impédance de la couche active formée, un rapport signal/bruit élevé.

Enfin, comme on le verra plus loin, les éléments conducteurs, réalisés par exemple sous forme de champignons, présentent une bonne tenue mécanique, ce qui permet de préserver la distance entre les électrodes.

Selon un mode préféré de réalisation du dispositif de l'invention, le premier conducteur a la forme d'un peigne à dents larges, le second conducteur a la forme d'un peigne à dents plus étroites, les dents du second conducteur étant intercalées entre les dents du premier conducteur et supportant des éléments conducteurs s'étendant au-dessus des dents du premier conducteur.

Le dispositif de l'invention est utilisable pour la détection d'analytes de divers types. A titre d'exemple de tels analytes, notamment dans le domaine médical, on peut citer les antigènes, les haptènes, les anticorps, les peptides, les fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN), les enzymes et les substrats d'enzymes.

Pour cette détection, conformément à l'invention, l'une au moins des électrodes du dispositif est recouverte d'un ligand spécifique de l'analyte à détecter, par exemple par greffage direct ou indirect de ce ligand sur la (les) électrodes. Lorsque la(les) électrode(s) ainsi recouverte(s) sont en contact avec un échantillon contenant l'analyte correspondant, il se forme un complexe analyte-ligand, ou couche active, sur la (les) électrode(s), et on détecte directement la présence de ce complexe par une mesure électrique d'impédance.

Les ligands spécifiques recouvrant la ou les électrodes sont ceux qui présentent au moins un site de reconnaissance de l'analyte et qui sont susceptibles de se lier à ce dernier. Le couple ligand-analyte peut ainsi appartenir aux couples antigène-anticorps, haptène-anticorps, hormone-récepteur, ADN-ADN_c, ARN-ARN_c, enzyme-substrat, ou tout autre association de molécules biologiques ou non, capables de former entre elles des complexes.

L'invention a également pour objet un procédé de fabrication du dispositif décrit ci-dessus. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

a) former sur un support isolant un premier conducteur et un second conducteur espacés l'un de l'autre,

b) revêtir le support isolant comportant les premier et second conducteurs d'une couche isolante,

c) graver cette couche isolante pour mettre à nu des zones du second conducteur qui serviront de plots de contact électrique,

d) former sur ces zones et au-dessus de la couche isolantes des éléments conducteurs par croissance galvanique d'un métal ,et

e) éliminer la couche isolante par
5 dissolution dans un solvant, ne dissolvant ni les premier et second conducteurs, ni le métal des éléments conducteurs.

Selon une variante de réalisation de ce procédé, celui-ci comprend de plus le dépôt d'une
10 couche métallique au-dessus de la couche isolante, qui servira de fonds pour la croissance galvanique des éléments conducteurs et présentera des dimensions correspondant à celles des éléments conducteurs à former.

15 Selon cette variante, les étapes d) et e) du procédé défini ci-dessus sont remplacées par les étapes suivantes :

d') déposer sur l'ensemble une couche métallique, puis une couche de résine de
20 photolithographie,

e') insoler la résine et la développer pour mettre à nu des zones de la couche métallique ayant les dimensions des éléments conducteurs à former,

25 f') former sur ces zones de la couche métallique les éléments conducteurs par croissance galvanique d'un métal,

g') éliminer la résine et la couche métallique sauf sur les endroits qui correspondent aux
30 éléments conducteurs, et

h') éliminer la couche isolante par dissolution dans un solvant, ne dissolvant ni les

premier et second conducteurs, ni le métal des éléments.

Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, on peut utiliser soit un support isolant
5 en verre, soit un support isolant en silicium.

Dans le cas d'un support isolant en verre, on forme de préférence, les premier et second conducteurs par dépôt de métal sur le support isolant aux endroits correspondants. Ceci peut être effectué par une
10 métallisation suivie d'une gravure pour définir les zones conductrices correspondant aux premier et second conducteurs.

Dans le cas où l'on part d'un support isolant en silicium, on forme de préférence les premier second
15 conducteurs sur ce support par implantation d'ions, par exemple d'ions bore ou phosphore aux endroits voulus.

Dans les deux cas, on dépose ensuite sur le support comportant les premier et second conducteurs, une couche isolante, par exemple de silice, que l'on
20 grave ensuite pour définir sur le second conducteur les plots de contact des éléments conducteurs qui formeront la seconde électrode. Ceux-ci peuvent être obtenus par croissance galvanique d'un métal tel que l'or.

Comme on le verra plus loin, les différentes
25 étapes de ce procédé de fabrication peuvent être réalisées par les techniques employées de façon classique en microélectronique.

Après réalisation de ces étapes, on effectue généralement une étape complémentaire de revêtement du
30 premier conducteur et des éléments conducteurs, soit des électrodes du dispositif, par un ligand spécifique de l'analyte à détecter.

Le mode de réalisation de cette étape dépend, d'une part, du matériau constituant les électrodes et, d'autre part, du ligand spécifique utilisé.

D'autres caractéristiques et avantage de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Brève description des dessins.

10

La figure 1 est une vue en perspective d'un dispositif de détection conforme à l'invention.

La figure 2 est une vue en coupe verticale du dispositif de l'invention suivant la ligne XX' de la figure 1.

15

Les figures 3 à 7 illustrent les étapes principales de fabrication du dispositif de la figure 1 dans le cas où le support isolant est un verre.

Les figures 8 à 12 illustrent une variante de réalisation du procédé de fabrication illustré par les figures 3 à 7.

20

Les figures 13 à 17 illustrent un autre mode de réalisation du dispositif de la figure 1 adapté à l'emploi d'un support en silicium.

25

Exposé détaillé des modes de réalisations.

Sur la figure 1, on a représenté en perspective un microsystème pour analyse biologique conforme à l'invention.

30

Ce microsystème comprend un support isolant 1 muni sur sa surface supérieure d'un premier conducteur 3 et d'un second conducteur 5. Le premier conducteur 3

qui constitue l'une des électrodes du microsystème, a la forme d'un peigne dont les dents 3a sont relativement larges par rapport à l'espace entre dents successives.

5 Le second conducteur 5 a également la forme d'un peigne comportant des dents 5a intercalées entre les dents 3a du premier conducteur 3, ces dents 5a sont plus étroites que les dents 3a et elles supportent des éléments conducteur 7 ayant la forme de champignons qui
10 s'étendent au-dessus du premier conducteur 3 à une distance d de celui-ci. Les éléments conducteurs 7 forment la seconde électrode du microsystème. Les électrodes 3 et 7 peuvent être reliées à un circuit électrique extérieur respectivement par les conducteurs
15 13 et 15 en vue de polariser les électrodes et d'effectuer des mesure d'impédance entre celles-ci.

Sur la figure 2 qui est une coupe verticale du dispositif de la figure 1 selon la ligne XX', on voit que l'élément conducteur 7 en forme de champignon est
20 disposé à une distance d des dents 3a du premier conducteur 3, en étant supporté par les dents 5a du second conducteur. Comme on peut le voir sur cette figure, la forme de champignon permet d'avoir une surface d'électrode importante pour la réaction de
25 reconnaissance de l'analyte à détecter.

Sur les figures 3 à 7, on a représenté de façon schématique la réalisation du microsystème de la figure 1 en partant d'un support isolant en verre. La réalisation est effectuée par un procédé « froid »,
30 les étapes de fabrication s'effectuant à des températures ne dépassant pas 300K.

La figure 3 illustre la réalisation de la première étape du procédé de fabrication selon laquelle

on dépose sur le support 1 les premier et second conducteurs ayant la forme de peignes. Ceci peut être effectué par métallisation du support 1, suivie d'une gravure qui permet de définir les zones conductrices qui constitueront le premier conducteur en forme de peigne 3 avec ses dents 3a et le second conducteur en forme de peigne 5 avec les dents 5a. Ces peignes peuvent être réalisés en or, en alliage or-chrome ou en alliage or-nickel-chrome. En effet, l'emploi d'or ou d'alliage d'or permet, d'une part, d'obtenir ensuite une bonne croissance galvanique des champignons et, d'autre part, de réaliser dans de bonnes conditions le greffage sur les électrodes de molécules biologiques qui constitueront le ligand spécifique de l'analyte à détecter.

Sur la figure 4, on a représenté la réalisation des étapes b) et c) du procédé de l'invention.

Dans l'étape b) on dépose sur le support revêtu obtenu dans la première étape, une couche isolante 6 par exemple de silice, que l'on grave ensuite pour mettre à nu les zones 7a correspondantes aux plots de contact entre le second conducteur et les éléments en forme de champignons. Ceci peut être effectué en déposant à froid la couche 6, par exemple par PECVD (dépôt chimique en phase vapeur activé par plasma) ou par dépôt à la tournette de silice colloïdale. Les trous correspondant aux plots de contact sont ensuite pratiqués dans la couche 6 par photolithogravure.

On peut utiliser dans ce but une résine organique photosensible au ultraviolets et éliminer la couche de silice aux endroits voulus correspondant aux plots de contact par dissolution dans l'acide fluorhydrique. On obtient ainsi la configuration

représentée sur la figure 4 où les trous 7a correspondent aux plots de contact des éléments conducteurs 7.

Sur la figure 5, on a illustré l'étape d) du procédé de l'invention. Dans cette étape, on forme les éléments conducteurs 7 en forme de champignons par croissance galvanique de métal, en utilisant les plots de contact comme électrodes de dépôt. Lorsque le métal est de l'or ou un alliage d'or, elle peut être effectuée à température ambiante avec une tension de polarisation de l'ordre du volt. Cette croissance galvanique développe directement la forme de champignon.

Sur la figure 6, on a représenté l'étape e) du procédé de l'invention dans laquelle on retire la couche de silice 6 par dissolution au moyen d'acide fluorhydrique. On obtient ainsi le dispositif représenté sur la figure 1.

En vue de son utilisation pour la détection d'analyte, ce dispositif est soumis à une dernière étape de revêtement des deux électrodes par un ligand spécifique de l'analyte à détecter. Dans ce but, on modifie la surface des électrodes par exemple par des thioalcanes lorsque les électrodes sont en or.

Sur les figures 8 à 12, on a représenté une variante de réalisation du procédé décrit ci-dessus.

Dans cette variante, les premières étapes du procédé sont réalisées comme il est illustré sur les figures 3 et 4, mais après gravure de la couche de silice et obtention de la configuration représentée sur la figure 4, on dépose une couche continue de métal sur l'ensemble du support.

La figure 8 illustre cette étape qui peut être réalisée par pulvérisation cathodique d'un métal. Sur cette figure, on voit la couche de métal 8.

Après ce dépôt, on recouvre l'ensemble d'une
5 résine de photolithographie qui sera durcie ensuite par irradiation de façon à devenir insoluble sur certaines zones du substrat, la résine non durcie étant éliminée par un solvant approprié.

Les figures 9 et 10 représentent ces étapes.
10 Sur la figure 9, on voit le support recouvert de la couche continue métallique 8 qui est revêtu de la couche de résine 9, par exemple la résine organique photosensible aux ultraviolets.

Par insolation sur les zones voulues repérées
15 par des flèches, on durcit cette résine pour la rendre insoluble.

Sur la figure 10, on a représenté l'ensemble après élimination de la résine non durcie, ce qui met à nu la couche métallique 8 sur des zones qui
20 correspondent aux éléments conducteurs 7 à former.

La figure 11 illustre la réalisation des éléments conducteurs 7. Ceci peut être effectué par croissance galvanique, par exemple d'or, dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. On obtient la
25 structure représentée sur la figure 11 où les éléments 7 sont délimités dans la couche de résine durcie 9.

Bien entendu, on peut utiliser à la place de la résine durcissable, une résine susceptible d'être dégradée et rendue soluble par irradiation, les zones
30 irradiées étant dans ce cas inversées.

Sur la figure 12, on a représenté l'étape d'élimination de la couche de résine durcie 9 et de la couche métallique 8 sur les zones qui ne correspondent

pas aux éléments conducteurs 7. Ceci peut être effectué par applications d'un plasma oxygène.

On obtient la structure représentée sur la figure 12 qui correspond sensiblement à celle de la figure 5.

On réalise ensuite l'étape d'élimination de la couche 6 de silice et l'étape de greffage d'un ligand comme dans le cas des figures 6 et 7.

Sur les figures 13 à 17, on a décrit un autre mode de réalisation du dispositif de la figure 1, à partir d'un support isolant en silicium. Le procédé utilisé est un procédé de type microélectronique silicium. Les étapes de fabrication sont compatibles avec les lignes de fabrication de circuits CMOS.

La figure 13 illustre la première étape du procédé selon laquelle on forme sur le support le premier et le second conducteurs. Dans ce cas, on réalise les zones conductrices correspondant aux peignes 3 et 5 par implantation d'ions dans le support en silicium pour le rendre conducteur sur ces zones représentées par 3a et 5a sur la figure. Les ions utilisés pour l'implantation sont par exemple des ions de bore ou phosphore, et on réalise l'implantation à travers un masque définissant les zones à planter en utilisant une énergie suffisante pour rendre conducteur le silicium sur ces zones, sur une épaisseur de quelques 1 000 Å à 1 micron.

La figure 14 illustre l'étape b) du procédé, dans laquelle on forme sur l'ensemble une couche isolante 6. Cette couche isolante est de la silice qui peut être formée par oxydation thermique du silicium sur l'ensemble du support (zones implantées et non implantées). Après cette étape, l'épaisseur des zones

implantées est plus faible. La figure 9 illustre également l'étape c) du procédé de l'invention dans laquelle on grave la couche isolante 6 pour mettre à nu certaines zones 7a du second conducteur qui serviront
5 de plots de contact. Cette gravure peut être réalisée par photolithogravure dans les mêmes conditions que précédemment.

Sur la figure 15, on a représenté l'étape intermédiaire de métallisation des plots de contact 10
10 qui peut être effectuée par une métallisation complète suivie d'une gravure localisée correspondant à l'emplacement des plots de contacts.

La figure 16 représente l'étape de formation des éléments conducteurs au-dessus de la couche 6. Ceci
15 peut être effectué par croissance galvanique comme dans le cas de la figure 5.

La figure 17 représente l'étape e) d'élimination de la couche de silice, par exemple au moyen d'acide fluorhydrique.

20 La dernière étape du procédé peut être réalisée comme précédemment en greffant sur les éléments conducteurs 7 et sur l'électrode formée par le premier conducteur 3 un ligand spécifique de l'analyte à détecter.

25 Lorsque le conducteur 3 et les éléments 7 sont en or ou en alliage d'or, on modifie la surface des électrodes par des thioalcanes, puis on fixe le ligand sur les surfaces d'or ainsi modifiées par réaction entre le ligand et les chaînes terminales de
30 thioalcanes.

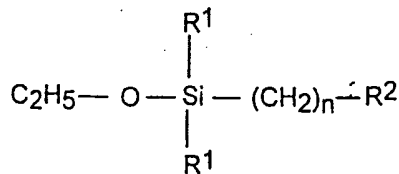
Lorsque le premier conducteur 3 est en silicium, cette fixation peut être effectuée par des techniques classiques, par exemple par adsorption sur

l'électrode après l'avoir oxydée très superficiellement, ou par formation d'une liaison covalente entre l'électrode et le ligand en utilisant un réactif de couplage bifonctionnel capable de réagir
5 à la fois avec l'électrode et avec le ligand.

L'utilisation de tels réactifs est bien connue. A titre d'exemple de réactif convenant pour le couplage de ligands constitués par des anticorps, des protéines et des peptides, sur le silicium, on peut citer les
10 dérivés de silane comportant un groupe alkoxysilane et un groupe NH_2 séparés l'un de l'autre par une chaîne hydrocarbonée. Des techniques de ce type sont décrites dans les références 1, 3 et 4 citées précédemment.

Ainsi, on peut modifier chimiquement le
15 silicium par un alcoxy ou un chlorosilane comportant une fonction capable de réagir avec le ligand spécifique, par exemple un groupe terminal-CN, -NH_2 ou -SH . En effet, ces groupes sont capables de réagir après activation par un agent fonctionnel approprié,
20 avec les groupements de molécules telles que des fragments d'anticorps et des oligonucléotides.

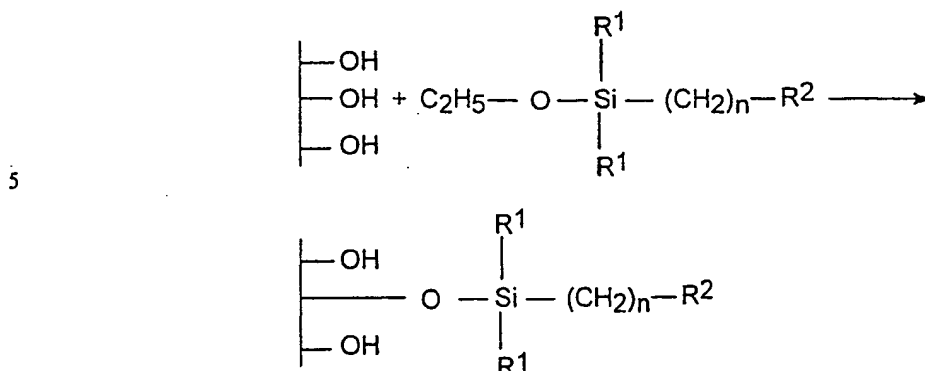
A titre d'exemple d'alcoxy silane utilisable, on peut citer les composés de formules :



25

dans laquelle R^1 représente CH_3 , C_2H_5 , OCH_3 ou OCH_2H_5 , R^2 représente -CN , -NH_2 ou -SH , et n est un nombre entier de 1 à 17.

De tels composés se fixent sur le silicium par réaction avec les hydroxyles libres, selon le schéma réactionnel :



Lorsque R^2 représente NH_2 , on peut fixer sur ce groupe un fragment d'oligonucléotide par des réactions classiques.

10 Lorsque R^2 représente SH , on peut fixer sur ce groupement un fragment d'anticorps également par des réactions de couplage classiques.

On précise que les techniques utilisables pour réaliser les différentes étapes de fabrication du
15 microsystème sont celles de la microélectronique.

L'utilisation des microtechnologies permet notamment :

- d'améliorer la sensibilité du dispositif (contrôle précis des géométries, des paramètres
20 optiques ou électriques),
- d'améliorer la spécificité de la détection en utilisant plusieurs dispositifs du même type sur une seule plaquette de silicium (redondance, détection multiple),

- d'améliorer la fiabilité de la détection en s'affranchissant des problèmes de pollutions localisées ou de réactions non spécifiques, et

- d'obtenir une réduction du coût de fabrication (miniaturisation des éléments sensibles, utilisation des techniques collectives d'hybridation et de packaging développées pour les microsystèmes).

Ainsi, ces dispositifs fabriqués par des procédés de microtechnologies offriront-ils aux utilisateurs finaux, notamment aux laboratoires d'analyse décentralisés, l'avantage d'une haute praticabilité.

Le dispositif de l'invention dont les éléments conducteurs 7 et éventuellement le premier conducteur 3 ont été revêtus d'un ligand spécifique approprié, peut être utilisé pour la détection d'analyte de la façon suivante.

On dépose sur la plaquette support 1 une goutte de l'échantillon à analyser. Etant donné les dimensions de la plaquette, la goutte recouvre les éléments 7 et l'électrode 3. Si l'échantillon contient l'analyte A, il se forme une couche active sur la surface des électrodes 3 a et 7 par formation du complexe L-A qui occupe pratiquement toute l'épaisseur d entre les électrodes. On détecte la présence de cette couche par une mesure de l'impédance entre ces électrodes.

Ceci peut être effectué en appliquant aux électrodes 3 et 5 une tension appropriée et en mesurant l'intensité du courant circulant entre ces électrodes. En comparant cette mesure avec une mesure effectuée dans les mêmes conditions en l'absence d'analyte, on peut vérifier si l'épaisseur de la couche sensible a augmenté et en déduire la présence ou non d'analyte.

Références citées :

- (1) Battaillard et al, Analytical Chemistry,
60, 1988, pages 2374-2379.
- 5 - (2) Schyber et al, Sensors and Actuators,
B26-27, 1995, pages 457-460.
- (3) FR-A-2 598 227
- (4) EP-A-244 326

REVENDICATIONS

1. Dispositif de détection d'un analyte, comprenant :

5 - un support isolant (1) revêtu d'un premier conducteur (3) formant une première électrode, et d'un second conducteur (5) supportant une pluralité d'éléments conducteurs (7) s'étendant au-dessus du premier conducteur de façon à former une seconde
10 électrode coplanaire disposée à une distance d du premier conducteur, et

 - des moyens de polarisation (13, 15) du premier et du second conducteurs.

2. Dispositif selon la revendication 1, dans
15 lequel l'une au moins des électrodes est recouverte d'un ligand spécifique L de l'analyte A à détecter.

3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le premier conducteur a la forme d'un peigne à dents larges (3a), le second conducteur a la
20 forme d'un peigne à dents plus étroites (5a), les dents du second conducteur étant intercalées entre les dents du premier conducteur et supportant des éléments conducteurs (7) s'étendant au-dessus des dents du premier conducteur.

25 4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel la distance d est de 20 à 500 nm.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le support est en
30 verre, le premier et le second conducteurs sont réalisés en métal et les éléments conducteurs sont en métal.

6. Dispositif selon la revendication 5, dans lequel le métal est l'or ou un alliage d'or.

7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le support est en silicium, le premier et le second conducteurs sont en silicium rendu conducteur par implantation d'ion, et les éléments conducteurs formant la seconde électrode sont en métal.

8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel le métal est l'or.

9. Procédé de fabrication d'un dispositif selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :

a) former sur un support isolant (1) un premier conducteur (3) et un second conducteur (5) espacés l'un de l'autre,

b) revêtir le support isolant comportant les premier et second conducteurs d'une couche isolante (6),

c) graver cette couche isolante pour mettre à nu des zones (7a) du second conducteur qui serviront de plots de contact électrique,

d) former sur ces zones et au-dessus de la couche isolante des éléments conducteurs (7) par croissance galvanique d'un métal ,et

e) éliminer la couche isolante (6) par dissolution dans un solvant, ne dissolvant ni les premier et second conducteurs, ni le métal des éléments conducteurs.

10. Procédé de fabrication d'un dispositif selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :

a) former sur un support isolant (1) un premier conducteur (3) et un second conducteur (5) espacés l'un de l'autre,

b) revêtir le support isolant
5 comportant les premier et second conducteurs d'une couche isolante (6),

c) graver cette couche isolante pour mettre à nu des zones (7a) du second conducteur qui serviront de plots de contact électrique,

10 d) déposer sur l'ensemble une couche métallique (8), puis une couche (9) de résine de photolithographie,

e) insoler la résine et la développer pour mettre à nu des zones de la couche métallique
15 ayant les dimensions des éléments conducteurs (7) à former,

f) former sur ces zones de la couche métallique les éléments conducteurs (7) par croissance galvanique d'un métal,

20 g) éliminer la résine (9) et la couche métallique (8) sauf sur les endroits qui correspondent aux éléments conducteurs (7), et

h) éliminer la couche isolante (6) par dissolution dans un solvant, ne dissolvant ni les
25 premier et second conducteurs, ni le métal des éléments.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, comportant en outre une étape de revêtement du premier conducteur et des éléments
30 conducteurs par un ligand L spécifique de l'analyte à détecter.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel l'étape a) consiste

à déposer un métal sur le support isolant aux endroits correspondant aux premier et second conducteurs.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, dans lequel le support étant en silicium, on forme sur ce support le premier et le second conducteurs par implantation d'ions.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, dans lequel dans l'étape b), on dépose une couche de silice sur le support comportant les premier et second conducteurs, on grave cette couche dans l'étape c) par photolithogravure, et on élimine cette couche en fin d'opération par dissolution dans l'acide fluorhydrique.

15. Procédé selon les revendications 11 et 12, dans lequel le métal des éléments conducteurs étant de l'or, on modifie celui-ci par des thioalcanes avant de revêtir les éléments par le ligand spécifique de l'analyte à détecter.

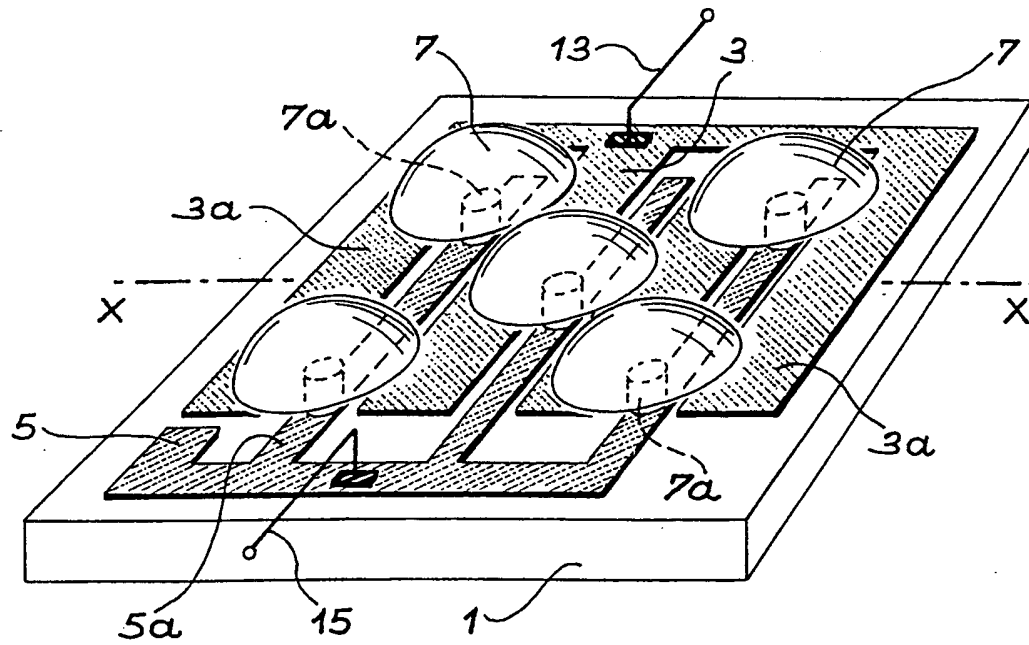


FIG. 1

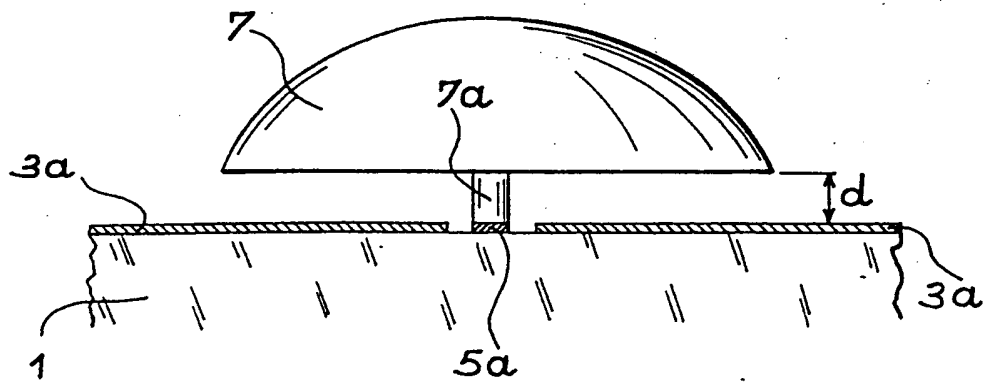


FIG. 2

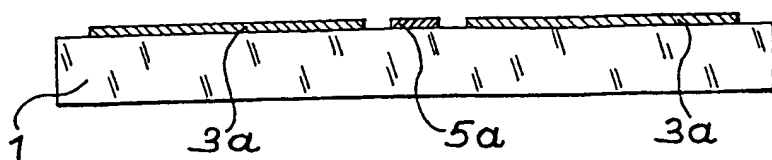


FIG. 3

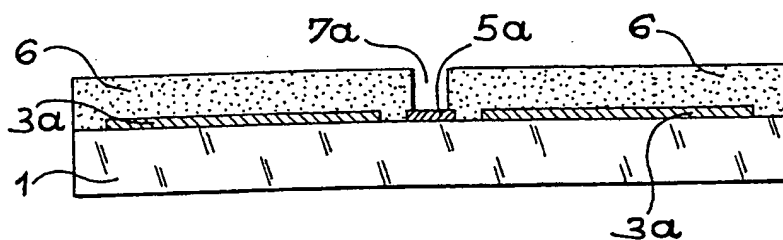


FIG. 4

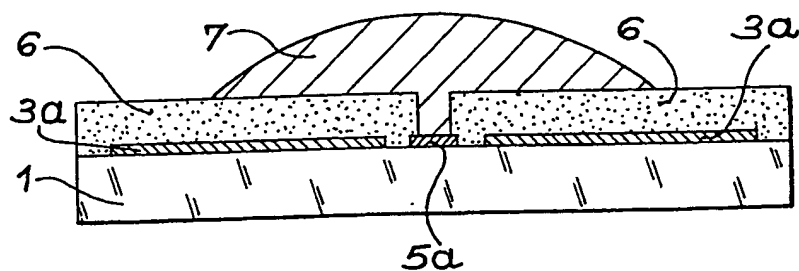


FIG. 5

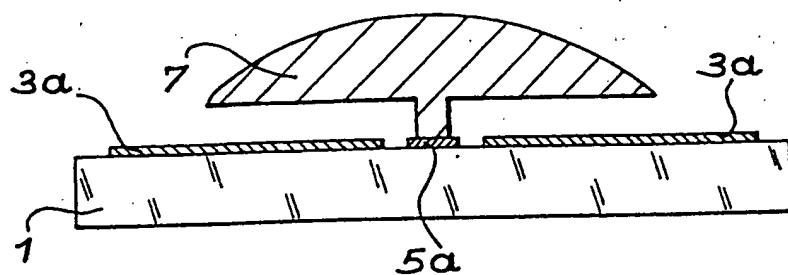


FIG. 6

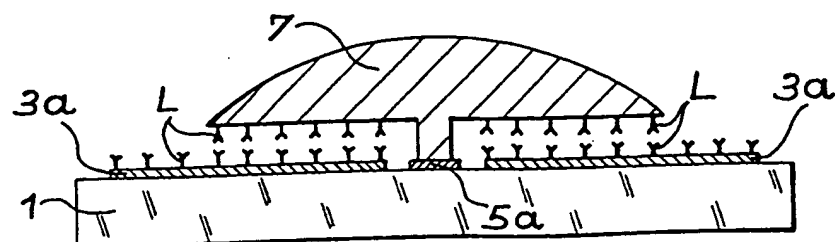


FIG. 7

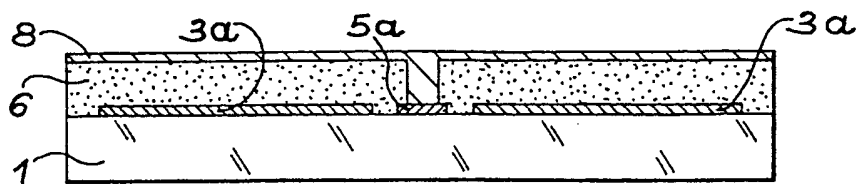


FIG. 8

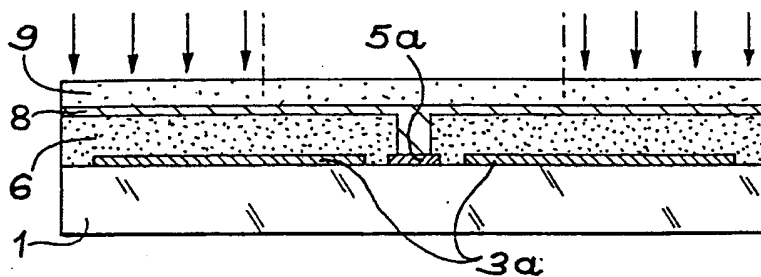


FIG. 9

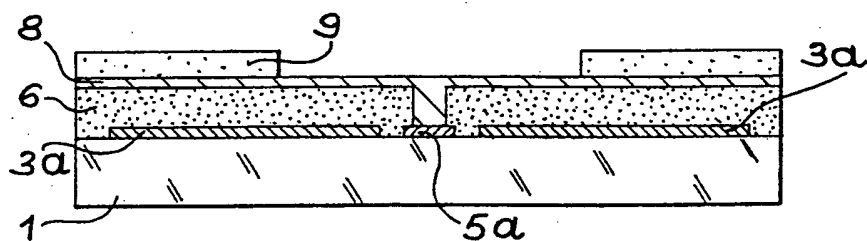


FIG. 10

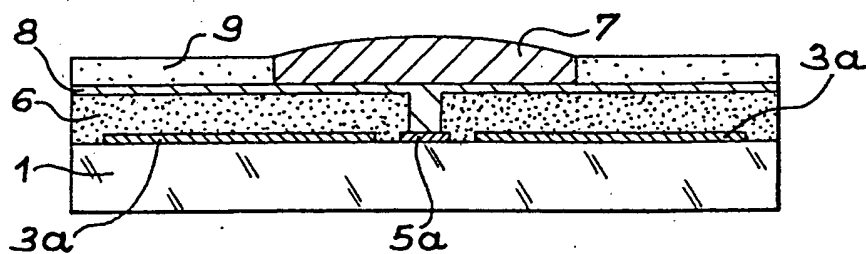


FIG. 11

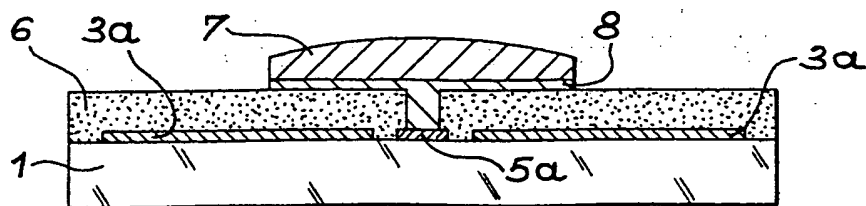


FIG. 12

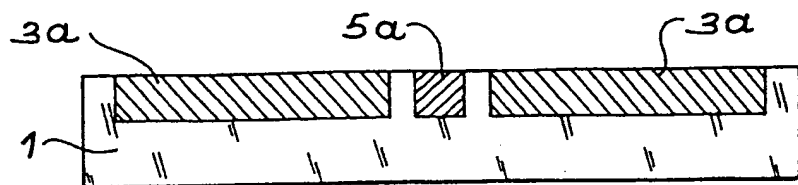


FIG. 13

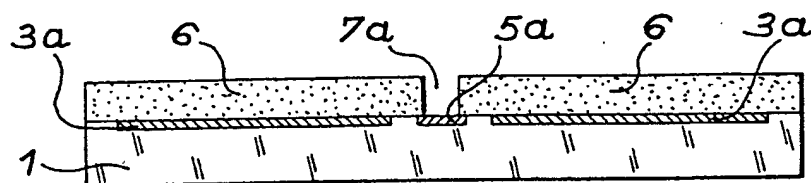


FIG. 14

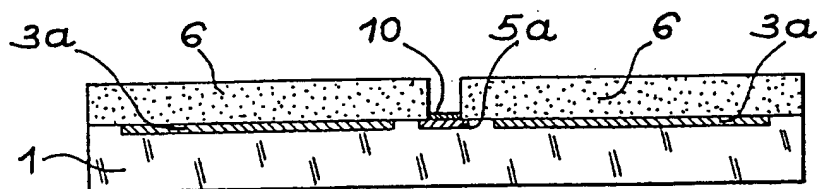


FIG. 15

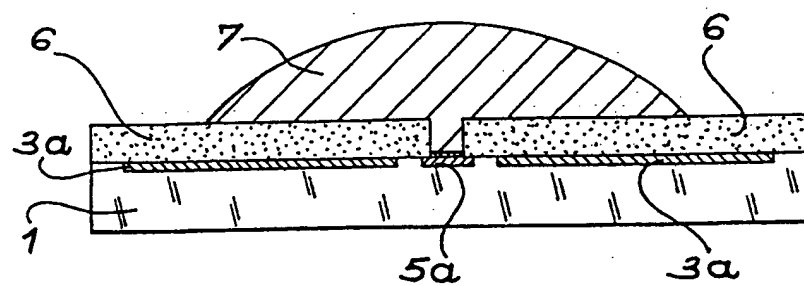


FIG. 16

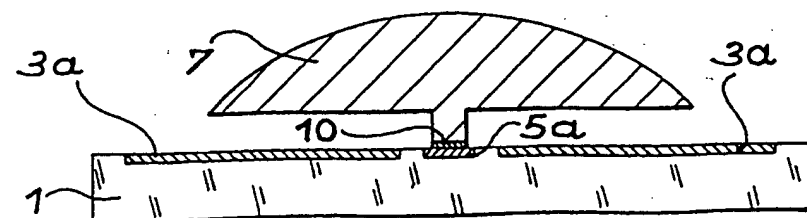


FIG. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N27/327 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 244 326 A (BIO MERIEUX) 4 November 1987 cited in the application see the whole document ---	1
X	WO 94 23287 A (DENKI KAGAKU KEIKI KK ;KARUBE ISAO (JP); CHEN CHIEN YUAN (CN); YAG) 13 October 1994 see abstract --- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 1998

Date of mailing of the international search report

04/05/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/02440

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>C. SCHYBERG ET AL: "Impedance analysis of Si/SiO₂ structures grafted with biomolecules for the elaboration of an immunosensor."</p> <p>SENSORS AND ACTUATORS B, vol. 26-27, 1995, LAUSANNE CH, pages 457-460, XP002039082 cited in the application see the whole document</p>	1
A	<p>P. BATAILLARD ET AL: "Direct detection of immunospecies by capacitance measurements"</p> <p>ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 60, 1988, COLUMBUS US, pages 2374-2379, XP002039081 cited in the application see the whole document</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Inde Internationale No

PCT/FR 97/02440

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>C. SCHYBERG ET AL: "Impedance analysis of Si/SiO₂ structures grafted with biomolecules for the elaboration of an immunosensor."</p> <p>SENSORS AND ACTUATORS B, vol. 26-27, 1995, LAUSANNE CH, pages 457-460, XP002039082 cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>----</p>	1
A	<p>P. BATAILLARD ET AL: "Direct detection of immunospecies by capacitance measurements"</p> <p>ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 60, 1988, COLUMBUS US, pages 2374-2379, XP002039081 cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document internationale No

PCT/FR 97/02440

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0244326 A	04-11-87	FR 2598227 A	06-11-87
		DE 3787041 A	23-09-93
		DE 3787041 T	24-03-94
		ES 2002695 T	01-01-94
		PT 84810 B	29-12-89
WO 9423287 A	13-10-94	AU 6292494 A	24-10-94

This Page Blank (uspto)

NOT AVAILABLE COPY

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)
www.uspto.gov